

(19)日本国特許庁 (J P)

## (12) 公開特許公報 (A)

(11)特許出願公開番号

特開平11-332599

(43)公開日 平成11年(1999)12月7日

(51)IntCl.<sup>6</sup>

識別記号

F I

C 1 2 Q 1/68

C 1 2 Q 1/68

A

C 1 2 N 15/09

Z N A

1/10

C 1 2 Q 1/10

C 1 2 N 15/00

Z N A A

// C 1 2 N 15/09

Z N A

C 1 2 R 1:19)

審査請求 未請求 請求項の数4 O L (全 8 頁) 最終頁に続く

(21)出願番号 特願平10-149749

(71)出願人 000001993

(22)出願日 平成10年(1998)5月29日

株式会社島津製作所  
京都府京都市中京区西ノ京桑原町1番地

(72)発明者 福島 素

京都市中京区西ノ京桑原町1番地 株式会  
社島津製作所三条工場内

(72)発明者 高岡 直子

京都市中京区西ノ京桑原町1番地 株式会  
社島津製作所三条工場内

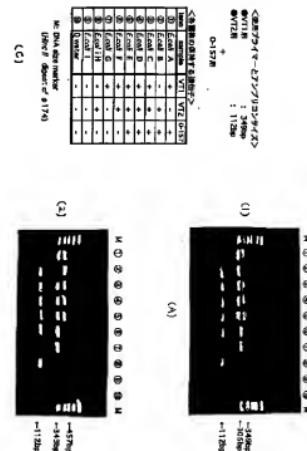
(74)代理人 弁理士 西岡 義明

(54)【発明の名称】 腸管出血性大腸菌検出のためのオリゴヌクレオチドおよびそれを用いた検出法

(57)【要約】

【課題】本発明は、食中毒・下痢症にかかる検査における、簡便、迅速、かつ高感度なEHECまたはVTECの検査法を提供することを目的とする。

【解決手段】本発明は、EHEC（またはVTEC）のベロ毒素遺伝子または病原性大腸菌O157のO抗原合成領域遺伝子と選択的にハイブリダイズする配列番号1～9のオリゴヌクレオチドを作製し、このオリゴヌクレオチドをプライマーとして遺伝子増幅に用いている。これにより、本菌の病原因子の一つであるO157を产生する菌およびベロ毒素を产生する大腸菌を選択的に検出することを特徴としている。



## 【特許請求の範囲】

【請求項1】検体中に存在する腸管出血性大腸菌(以下、EHEC)症の起因菌であるペロ毒素産生性大腸菌(以下、VTEC)、およびその大部分を占める病原性大腸菌O157を選択的に検出するためのオリゴヌクレオチド、または、ペロ毒素1型(VT1)遺伝子、ペロ毒素2型(VT2)遺伝子、ペロ毒素2型の変異型(VT2vh<sub>a</sub>、VT2vh<sub>b</sub>、VT2vp1、およびVT2vp2)の各遺伝子、および病原性大腸菌O157のO抗原合成領域遺伝子をコードするヌクレオチド配列を標的とし、そのヌクレオチドの配列と相補的となるように化学合成されたオリゴヌクレオチドの混合溶液。

【請求項2】請求項1記載の組合せオリゴヌクレオチドが配列番号1～9の各配列の少なくとも連続した10塩基以上を含むオリゴヌクレオチド。

【請求項3】請求項2記載の組合せオリゴヌクレオチドを次の(1)～(4)のいずれかの組み合わせで用いることを特徴とする検出法。

- (1) 配列番号1、2、3、4、5、7
- (2) 配列番号1、2、3、4、6、8
- (3) 配列番号1、2、4、5、7、9
- (4) 配列番号1、2、4、6、8、9

【請求項4】請求項第2項又は第3項に記載された配列のうち、少なくとも1つを有するオリゴヌクレオチドを鎖長反応のプライマーとして機能させ、標的ヌクレオチド配列を選択的に増幅させることを特徴とする方法であって、

(1) 検体中の1本鎖状態の標的ヌクレオチド配列にプライマーをハイブリダイゼさせ、4種のヌクレオチドの重合反応により鎖長反応を行わせ、

(2) 得られた2本鎖の標的ヌクレオチド配列を1本鎖に分離した場合、その相補鎖は他方のプライマーによる鎖長反応の雰囲として機能し、

(3) これら2種のプライマーによるハイブリダイゼーションを繰り返すことにより、特定のヌクレオチド配列が増幅され、電気泳動、またはクロマトグラフィーで増幅されたヌクレオチド断片を検出し、

(4) その結果、前記検体中に認識されるべき配列が存在しているか否かを判定することでEHECまたはVTECの検出を行うことを含む方法。

【発明の詳細な説明】

## 【0001】

【発明の属する技術分野】本発明は、臨床検査、食品の品質検査、とりわけ食中毒に関する検査、もしくは下痢症検査におけるEHECまたはVTECの検出・同定に関するものである。

## 【0002】

【従来の技術】腸管出血性大腸菌症の起因菌であるEHEC(またはVTEC)は出血性大腸炎に代表される食中毒症状のみでなく、小児の重篤な疾患である溶血性尿

毒症症候群(hemolytic uremic syndrome)の原因菌にもなることが認められており、近年、臨床検査では、本菌の検出が重要視されつつある。

【0003】EHEC(またはVTEC)にかかる検査における主な検査材料は、患者の糞便、食品、または患者の周辺環境から採取された水(飲料水、河川水等)である。これらの検体からEHECまたはVTECを検出し、同定しようとする場合、直接分離培養、一次確認培養試験、二次確認培養試験、抗血清による凝集反応試験、および毒素産生試験に至る操作を行わなければならぬ。ところが、これらの培養の各段階における所要時間は、それぞれ18～24時間であり、総所要時間にすると3～4日となり、非常に長時間なものとなる。したがって、現在のEHEC(またはVTEC)の検査法は、迅速性および簡便性に欠けており、実効的手段とはなり得ていない。一方、EHEC(またはVTEC)の血清型としては、O157:H7が代表的であり、腸管出血性大腸菌症の80%以上を占めることが明らかとなっている。

【0004】

【発明が解決しようとする課題】本発明は、オリゴヌクレオチドを核酸合成反応のプライマーとして機能せる遺伝子増幅技術により、EHEC(またはVTEC)の病原因子の一つであるペロ毒素の遺伝子とO157抗原合成領域遺伝子の各々の遺伝子を検出するものである。臨床検査、とりわけ食中毒・下痢症にかかる検査、とりわけ、重篤な疾患を引き起こす腸管出血性大腸菌症における、簡便、迅速、かつ高感度な検査法を提供することにある。

【0005】

【課題を解決するための手段】本発明は、EHEC(またはVTEC)のペロ毒素産生性大腸菌(以下、VTEC)、およびその大部分を占める病原性大腸菌O157を選択的に検出するためのオリゴヌクレオチド、または、ペロ毒素1型(VT1)遺伝子、ペロ毒素2型(VT2)遺伝子、ペロ毒素2型の変異型(VT2vh<sub>a</sub>、VT2vh<sub>b</sub>、VT2vp1、およびVT2vp2)の各遺伝子、および病原性大腸菌O157のO抗原合成領域遺伝子をコードするヌクレオチド配列を標的とし、そのヌクレオチドの配列と相補的となるように化学合成されたオリゴヌクレオチドの混合溶液である。

【0006】すなわち、本発明は、EHEC(またはVTEC)のペロ毒素遺伝子または大腸菌のO157抗原合成領域遺伝子と選択的にハイブリダイゼするオリゴヌクレオチドを作製し、このオリゴヌクレオチドをプライマーとして遺伝子増幅に用いている。これによって、病原性大腸菌のうち、ペロ毒素遺伝子を有する菌、またはO157の血清型を有する菌のみを選択的に検出することを特徴としている。

【0007】ここで、プライマーは、次の配列番号1～

9

配列番号1；

(5')d-CAACACTGGATGATCTCAG-(3') .. (a)

配列番号2；

(5')d-ATCAGTCGTCACTCACTGGT-(3') .. (b)

配列番号3；

(5')d-CCCCCCTCAACTGCTAATA-(3') .. (c)

配列番号4；

(5')d-CTGCTGTACAGTGACAAA-(3') .. (d)

配列番号5；

(5')d-ATCATTGACCGATTGACACC-(3') .. (e)

配列番号6；

(5')d-GTATTTGGAGACATGGGAGC-(3') .. (f)

配列番号7；

(5')d-ACATGAGGAGCATTAACTTCG-(3') .. (g)

配列番号8；

(5')d-ACTAATGACACGATTCTGTTCC-(3') .. (h)

配列番号9；

(5')d-CTGAATCCCCCTCATTATG-(3') .. (i)

の各配列を有する。

\*20\*【0008】また、上記プライマーは次の組み合わせ

組み合わせ(1)；

(5')d-CAACACTGGATGATCTCAG-(3') .. (a)

(5')d-ATCAGTCGTCACTCACTGGT-(3') .. (b)

(5')d-CCCCCCTCAACTGCTAATA-(3') .. (c)

(5')d-CTGCTGTACAGTGACAAA-(3') .. (d)

(5')d-ATCATTGACCGATTGACACC-(3') .. (e)

(5')d-ACATGAGGAGCATTAACTTCG-(3') .. (g)

組み合わせ(2)；

(5')d-CAACACTGGATGATCTCAG-(3') .. (a)

(5')d-ATCAGTCGTCACTCACTGGT-(3') .. (b)

(5')d-CCCCCCTCAACTGCTAATA-(3') .. (c)

(5')d-CTGCTGTACAGTGACAAA-(3') .. (d)

(5')d-GTATTTGGAGACATGGGAGC-(3') .. (f)

(5')d-ACTAATGACACGATTCTGTTCC-(3') .. (h)

組み合わせ(3)；

(5')d-CAACACTGGATGATCTCAG-(3') .. (a)

(5')d-ATCAGTCGTCACTCACTGGT-(3') .. (b)

(5')d-CTGCTGTACAGTGACAAA-(3') .. (d)

(5')d-ATCATTGACCGATTGACACC-(3') .. (e)

(5')d-ACATGAGGAGCATTAACTTCG-(3') .. (g)

(5')d-CTGAATCCCCCTCATTATG-(3') .. (i)

組み合わせ(4)；

(5')d-CAACACTGGATGATCTCAG-(3') .. (a)

(5')d-ATCAGTCGTCACTCACTGGT-(3') .. (b)

(5')d-CTGCTGTACAGTGACAAA-(3') .. (d)

(5')d-GTATTTGGAGACATGGGAGC-(3') .. (f)

(5')d-ACTAATGACACGATTCTGTTCC-(3') .. (h)

(5')d-CTGAATCCCCCTCATTATG-(3') .. (i)

で用いるのが好ましい。

ase Chain Reaction法(以下、PCR法と略す; Scie

【0009】遺伝子增幅は、Saikiらが開発したPolymerase 230, 1350(1985)をもとに行っている。この方法

は、ある特定のヌクレオチド配列領域（本発明の場合EHECまたはVTECのペロ毒素遺伝子および大腸菌のO157抗原合成領域遺伝子）を検出する場合、その領域の両端の一方は+鎖を、他方は-鎖をそれぞれ認識してハイブリダイゼーションするようなオリゴヌクレオチドを用意し、それを熱変性により1本鎖状態にした試料核酸に対し、鈍型依存性ヌクレオチド重合反応のプライマーとして機能させ、生成した2本鎖核酸を再び1本鎖に分離し、再び同様な反応を起こさせる。この一連の操作を繰り返すことで、2つのプライマーに挟まれた領域は検出できるまでにコピー数が増大していく。

【0010】検体としては、臨床検査材料、例えば、糞便、尿、血液、組織ホモジネートなど、また、食品材料でもよい。これら材料をPCRの試料としてもいるには、材料中に存在する菌体から核酸成分を遮離させる操作が前処理として必要となる。しかし、プライマーがハイブリダイズできる核酸が数分子から数十分子以上存在すればPCRは進むので、検査材料を溶菌酵素、界面活性剤、アルカリ等で短時間処理するだけでPCRを行なうに十分な核酸量を持った試料液が調製できる。本発明でプライマーとして用いられるオリゴヌクレオチドは、選択性や検出感度および再現性から考慮して、10塩基以上、望ましくは15塩基以上の長さを持つヌクレオチド断片で、化学合成あるいは天然のどちらでもよい。また、プライマーは、特に検出用として標識されていなくてもよい。

【0011】プライマーが規定している病原性大腸菌O157のO抗原合成領域遺伝子のヌクレオチド配列における增幅領域は、50塩基から2,000塩基、望ましくは、1,000塩基から1,000塩基となればよい。鈍型依存性ヌクレオチド重合反応には、耐熱性DNAポリメラーゼを用いているが、この酵素の起源については90～95°Cの温度で活性を保持しているが、どの生物種由来でもよい。熱変性の温度は90～95°C、プライマーをハイブリダイズさせるアニーリング操作の温度は37～65°C、重合反応は50～75°Cで、これを1サイクルとしたPCRを20から42サイクル行って増幅させる。

【0012】検出はPCRを終えた反応液をそのままアガロースゲル電気泳動にかけることで、増幅されたヌクレオチド断片の存在、およびその長さを確認できる。その結果から検体中にプライマーが認識すべき配列を持ったヌクレオチドが存在しているかどうかを判定することができる。この判定は、そのままO157抗原合成領域遺伝子をもつ大腸菌の有無を判定するものとなる。増幅されたヌクレオチド断片の検出には、その他の電気泳動法やクロマトグラフィーも有効である。また、上記プライマーの一つをラボープとして機能させ、膜上、あるいはその他支持体上の標的ヌクレオチド配列を選択的に検出してもよい。

## 【0013】

## 【実施例】（実施例1）

## 検体の調製

使用したEHEC（またはVTEC）は患者等から由來したものであり、総計347株であった。各菌株をLB培地（1%トリプトン、0.5%イーストエクストラクト、および1%塩化ナトリウムに接種し、37°C、好気的条件下で、終夜振とう培養を行った。各菌株培養液を1.0 mMトリス-塩酸緩衝液pH7.5（以下TE緩衝液）で10倍に希釈して、95°Cで10分間の加熱処理を行なった後、これらを遠心し、その上清を検体とした。

## 【0014】プライマーの合成

ペロ毒素産生性であり、かつその血清型がO157であるEHEC菌株のペロ毒素遺伝子およびO抗原合成領域遺伝子の塗基配列から、配列番号1～9に示した各配列を選び、それらと同じ配列のオリゴヌクレオチドを化学合成した。化学合成は、β-シアノエチルフォスホアミダイト法により行った。合成したオリゴヌクレオチドの精製は、C18逆相カラムを用いた高速液体クロマトグラフィーで行った。

## 【0015】PCR

前記検体液3μlを用い、それに滅菌蒸留水1.705μl、1.0x反応用緩衝液3μl、dNTP溶液4.8μl、プライマー(1)1.0μl、プライマー(2)1.0μl、および耐熱性DNAポリメラーゼ0.15μlを加えて、全量30μlの反応液を調製した。この反応液の入った容器にミネラルオイル(SIGMA社製)を50μl加え、反応液上に重層した。各使用した溶液の内容は次のとおりである。

【0016】10x反応用緩衝液：500mM KC1、100mM Tris-HCl pH8.3、15mM 塩化マグネシウム、

0.1% (w/V) ゼラチン

dNTP溶液：dATP、dTTP、dGTP、dTTPを混合させたもので各終濃度が1.25mM

プライマー(1)および(2)：前述した化学合成精製品の水溶液（濃度3.75 μM/ml）

プライマーの組合せ：前述の化学合成精製品を組合せて使用した。組合せは、請求項第3項に記載したとおりである。

【0017】耐熱性DNAポリメラーゼ：Taq DNAポリメラーゼ(5 unit/ml; PerkinElmer Cetus社製)

反応条件は、次のとおりである。

熱変性：94°C、1分

アニーリング：55°C、1分

重合反応：72°C、1分

熱変性からアニーリングを経て、重合反応に至る過程を1サイクル（所要時間5.7分）とし、これを3.5サイクル（総所要時間約3時間）行なった。これらの操作は、DNAサーマルサイクラー（Perkin Elmer Cetus社製）に

上記反応条件をプログラムして行った。

#### 【0018】検出

反応液から増幅されたヌクレオチド断片を検出するため、アガロースゲル電気泳動を以下のように行った。アガロースゲルはゲル濃度3% (W/V) とし、臭化エチジウム ( $0.5\mu\text{g}/\text{ml}$ ) を含むものを用いた。泳動の条件は定電圧100V、30分で行った。操作方法などに他の条件は、Maniatis等著 Molecular Cloning 第2版(1989)に記載されている技法を行った。反応液の他に分子量マーカーの泳動も同時にを行い、相対移動度の比較によりヌクレオチド断片の長さを算出した。

#### 【0019】抗O157血清による凝集試験

\* 使用した菌株のO抗原がO157であるかどうか、市販の抗O157血清(デンカ生研製)を用いた菌体の凝集試験によって調べた。凝集試験の詳細は、抗血清に添付の使用説明書に基づいて行った。

#### 【0020】結果

前述したように大腸菌のO157抗原合成領域遺伝子は、すでに塩基配列が決定されており、本発明のオリゴヌクレオチド、すなわち、プライマーがPCRにより増幅するヌクレオチドの大きさは、表1のとおりに容易に推定できる。

#### 【0021】

#### 【表1】

プライマーの組合せ	PCR増幅産物の推定値(塩基)		
	O157抗原合成領域遺伝子	VT1遺伝子	VT2遺伝子
(1)	305	349	112
(2)	457	349	112
(3)	305	609	112
(4)	457	609	112

たとえば、プライマーの組合せ(1)においては、O157抗原合成領域遺伝子の増幅産物として305塩基(または305塩基対)の長さのヌクレオチドが増幅されるはずである。また、ペロ毒素1型および2型の各遺伝子の増幅産物として、それぞれ349塩基(または349塩基対)および112塩基(または112塩基対)のヌクレオチドが増幅されることになる。これらの推定値と実際に増幅されたヌクレオチドの長さが一致した場合、このプライマーの組合せは、標的としている遺伝子領域を正しく増幅しており、かつ、当該菌株はその標的遺伝子を有していると判断した。

【0022】すなわち、プライマーの組合せ(1)では、305、349、および112塩基(または塩基対)の3つの増幅ヌクレオチドが検出された場合、その被検菌株には、O157抗原合成領域遺伝子、VT1遺伝子、およびVT2遺伝子が備わっていると判断され、その菌株の血清型はO157であり、ペロ毒素の1型および2型を產生するものと判断される。また、305塩基(または塩基対)のヌクレオチドが検出されず、かつVT2型遺伝子の増幅ヌクレオチドのみが検出された場合には、血清型がO157以外のペロ毒素產生性大腸菌であると判断される。

【0023】検出結果を図1、2に示す。図1(A)はプライマーの組み合わせが(1)の場合の電気泳動図、図1(B)はプライマーの組み合わせが(2)の場合の電気泳動図、図2(A)はプライマーの組み合わせが(3)の場合の電気泳動図、図2(B)はプライマーの

組み合わせが(4)の場合の電気泳動図である。また、図1、2の(C)は電気泳動図の各レーンを示す。

【0024】図1、2より各々のプライマーの組合せは、それぞれ標的とする遺伝子領域のみを増幅し、それ以外の遺伝子領域とは全く反応しなかった。すなわち、大腸菌のO157抗原合成領域遺伝子、VT1遺伝子、およびVT2遺伝子を正しく増幅し、腸管出血性大腸菌を正確に検出していることを示している。

#### 【0025】

【発明の効果】本発明では、PCR法を用いたこと、および腸管出血性大腸菌症の主要な起因菌である病原性大腸菌O157のO抗原合成領域遺伝子を標的とするプライマー、およびを腸管出血性大腸菌の病原因子の一つであるペロ毒素遺伝子標的とするプライマーとを組み合わせて使用したことにより、O157抗原有する大腸菌およびペロ毒素を產生しうる大腸菌の検出において、遺伝子増幅作用による高い検出感度と、2つ、あるいは、それ以上の数のプライマーで反応が規定されることによる高い選択性が得られる。また、検出感度が高いので、多量の検体を必要とせず、検体の前処理も簡便で済む。本発明における実施例では、反応時間3時間、検出にかかる操作が30分であった。そのうえ、検出にアガロースゲル電気泳動法と臭化エチジウムによる核酸染色法を用いることで、プライマー等を標識せずに検出が行える。しかも増幅されたヌクレオチドの長さを確認できるので、試験結果の信頼性は高いものとなる。

【0026】腸管出血性大腸菌症の検査には、発見患者

の迅速・適切な治療および防疫措置のために、遅滞のない正確な結果が要求される。また、本発明は、腸管出血性大腸菌症の主要な起因菌である病原性大腸菌O157の菌体の一部を構成している糖鎖抗原の遺伝子、およびその病原因子であるペロ毒素遺伝子を選択的に検出するものである。したがって、本発明により、腸管出血性大腸菌症の起因菌の検出・決定を迅速かつ正確に行うこと可能となる。

【0027】

【配列表】

配列番号 (SEQ ID NO) ; 1 \* 【0028】

配列番号 (SEQ ID NO) ; 2

配列の長さ	20塩基
配列の型	核酸
鎖の数	一本鎖
トポロジー	直鎖状
配列の種類	Genomic DNA
ハイポセティカル配列	NO
アンチセンス	NO

起源	<u>Escherichia coli</u>
配列の特徴	特徴を決定した方法 S

配列	ATCAGTCGTCACTCACTGGT
【0029】配列番号 (SEQ ID NO) ; 3	* ハイポセティカル配列 NO

配列の長さ	18塩基	アンチセンス	NO
配列の型	核酸	起源	<u>Escherichia coli</u>
鎖の数	一本鎖	配列の特徴	特徴を決定した方法 S
トポロジー	直鎖状	配列	CCCCCTCAACTGCTAATA
配列の種類	Genomic DNA	【0030】	

配列番号 (SEQ ID NO) ; 4

配列の長さ	19塩基
配列の型	核酸
鎖の数	一本鎖
トポロジー	直鎖状
配列の種類	Genomic DNA
ハイポセティカル配列	NO
アンチセンス	NO
起源	<u>Escherichia coli</u>
配列の特徴	特徴を決定した方法 S
配列	CTGCTGTCACAGTGACAAAA

【0031】

配列番号 (SEQ ID NO) ; 5

配列の長さ	21塩基
配列の型	核酸
鎖の数	一本鎖
トポロジー	直鎖状
配列の種類	Genomic DNA
ハイポセティカル配列	NO
アンチセンス	NO
起源	<u>Escherichia coli</u>
配列の特徴	特徴を決定した方法 S

II

配列 AT C A T T G A C G A T T G T A G C A C C

【0032】配列番号 (SEQ ID NO) ; 6 \*ハイポセティカル配列 NO

配列の長さ 20塩基

アンチセンス

NO

配列の型 核酸

起源

*Escherichia coli*

鎖の数 一本鎖

配列の特徴

特徴を決定した方法 S

トポロジー 直鎖状

配列

G T A T T G G A G A C A T G G G A G C

配列の種類 Genomic DNA

\* 【0033】

配列番号 (SEQ ID NO) ; 7

配列の長さ 21塩基

配列の型 核酸

鎖の数 一本鎖

トポロジー 直鎖状

配列の種類 Genomic DNA

ハイポセティカル配列 NO

アンチセンス NO

起源 *Escherichia coli*

配列の特徴 特徴を決定した方法 S

配列 A C A T G A G G A G C A T T A C T T C G

【0034】

配列番号 (SEQ ID NO) ; 8

配列の長さ 21塩基

配列の型 核酸

鎖の数 一本鎖

トポロジー 直鎖状

配列の種類 Genomic DNA

ハイポセティカル配列 NO

アンチセンス NO

起源 *Escherichia coli*

配列の特徴 特徴を決定した方法 S

配列 A C T A A T G A C A C G A T T C G T T C C

【0035】

配列番号 (SEQ ID NO) ; 9

配列の長さ 20塩基

配列の型 核酸

鎖の数 一本鎖

トポロジー 直鎖状

配列の種類 Genomic DNA

ハイポセティカル配列 NO

アンチセンス NO

起源 *Escherichia coli*

配列の特徴 特徴を決定した方法 S

配列 C T G A A T C C C C C T C C A T T A T G

【図面の簡単な説明】

【図1】(A)；プライマーの組み合わせが(1)の場合

合の電気泳動図、

(B)；プライマーの組み合わせが(2)の場合の電気

泳動図

(C)；各菌株の保持する遺伝子を示す図

【図2】(A)；プライマーの組み合わせが(3)の場合

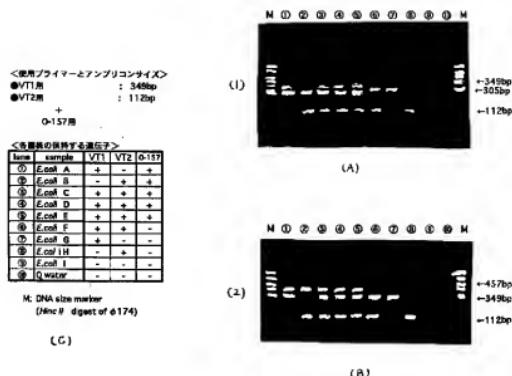
合の電気泳動図

(B)；プライマーの組み合わせが(4)の場合の電気

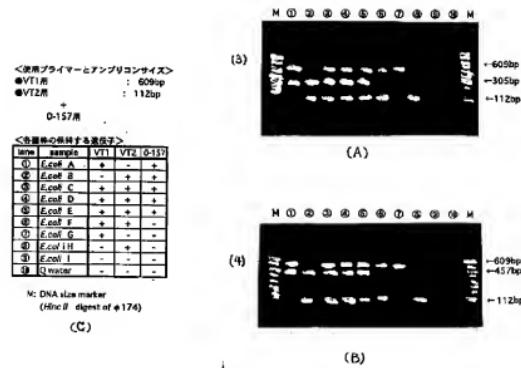
泳動図

(C)；各菌株の保持する遺伝子を示す図

【図1】



【図2】



フロントページの続き

(5) Int.CI.<sup>®</sup>  
(C 12 Q 1/10  
C 12 R 1:19)

認証記号

F I